

の天然化合物をスクリーニングすることにより、リード化合物を見出す予定である。

骨髄移植により骨髄由来の細胞が脳や脊髄に生着していることが確認された。また、組換えレンチウイルスベクターにより造血幹細胞にヒト ABCD1 を発現させ ABCD1 欠損マウスに移植することができた。現在、順調に飼育されている。今後、移植 5~6 ヶ月後の組織を調製し、生着細胞とその分布について組織化学染色により検討する予定である。本疾患に対する造血幹細胞移植の神経症状抑制のメカニズム解明は、発症機構及び治療戦略を考える上で重要である。

#### 新規遺伝子異常によるビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症 (ライソゾーム蓄積症) の解析

ABCD4 は単独で過剰発現させると、小胞体に局在したが、LMBD1 との共発現でライソゾームへ移行した。LMBD1 は単独でもライソゾームに局在することから、LMBD1 は ABCD4 をライソゾームへと移行させるキャリアタンパク質としての機能を持つことが示唆された。変異体を用いた解析から、両者の複合体形成には、ABCD4 の N 末端側の 2 つの膜貫通領域、LMBD1 の N 末端側の 5 つの膜貫通領域に重要な部位が存在する可能性が示唆された。さらに、LMBD1 の 6 番目の膜貫通領域以降にライソゾームへの移行シグナルが含まれていることも示唆された。今回、それぞれの変異により同様のフェノタイプが現れる理由が理解できた。今後、我が国においても重篤なビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症患者から、患者を同定し治療法を確立する必要がある。

## E. 結論

### ABCD1 の機能解析

ヒト ABCD1 が ATPase 活性とともに acyl-CoA thioesterase 活性を有していることを明らかにした。また、acyl-CoA thioesterase 活性には 149 番目の Ser が活性中心であることも明らかにした。ABCD1 の基質輸送における thioesterase 活性の意義とともに、基質輸送メカニズムを解明することが可能になった。

### 変異型 ABCD1 を安定化する治療薬の開発

ミスセンス変異 ABCD1 の安定化に有効な既存薬 2 種類及び天然化合物 2 種類を見いだした。既存薬については今後、治療薬としての有効性を検証する。天然化合物については、さらに多くの化合物をスクリーニングし、治療薬のリード化合物を見出す。一方、ヒト ABCD1 を発現した造血幹細胞を ABCD1 欠損マウスに移植した。今後、脳や脊髄での ABCD1 タンパク質の分布や脂肪酸含量への効果について検討する予定である。

### 新規遺伝子異常によるビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症 (ライソゾーム蓄積症) の解析

ABCD4 は単独ではライソゾームへと局在しないことから、ABCD4 がビタミン B<sub>12</sub> の輸送体として機能し、LMBD1 が ABCD4 のライソゾームへの移行を補助するキャリアタンパク質として機能すると考えられる。我々は、メタノール資化性酵母を用いたヒト ABCD4 の発現と精製に成功しているため、今後、リポソームに精製 ABCD4 を組み込んだプロテオリポソームを構築することにより、ABCD4 のビタミン B<sub>12</sub> 輸送機能が明らかになると考えて

いる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Morita M, Kobayashi J, Yamazaki K, *et al.*: A novel double mutation in the *ABCD1* gene in a patient with X-linked adrenoleukodystrophy: Analysis of the stability and function of the mutant ABCD1 protein. *J Inherit Metab Dis Rep* 10: 95-102, 2013
- 2) Hama K, Nagai T, Nishizawa C, *et al.*: Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. *Lipids* 48: 1253-1267, 2013

### 2. 学会発表

- 1) 有村洸平, 守田雅志, Kostsin DG, 山崎こず枝, 下澤伸行, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィーの治療薬開発: ABCD1 タンパク質の安定化を指標としたスクリーニング系の構築患. 第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム. 東京, 2013. 6
- 2) 池島俊季, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の機能解析. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9
- 3) Kostsin DG, Morita M, Yamazaki K, Arimura K, Shimozawa N, Imanaka T: Establishment and application of fluorescence-based assay for screening of chemical compounds that stabilize

mutant ABCD1 protein responsible for adrenoleukodystrophy. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜, 2013. 9

- 4) 池島俊季\*, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: メタノール資化性酵母を用いたペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の発現と機能解析. 第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム. 東京, 2013. 9
- 5) 岡元拓海, 川口甲介, 金林峰, 守田雅志, 今中常雄: ABC トランスポーター ABCD4 のリソソームへの局在化機構の解析. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013. 11
- 6) 松本隼, 守田雅志, 渡邊康春, 長井良憲, 小林博司, 高津聖志, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィー: レンチウイルスベクターを用いた ABCD1 遺伝子発現と骨髄移植. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013. 11
- 7) 高崎満喜子, 渡邊雄一, 深澤力也, 川口甲介, 守田雅志, 大熊芳明, 今中常雄: ペルオキシソーム膜形成因子 Pex3p と相互作用するタンパク質の検索. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013.11
- 8) 兵藤沙織, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄: リソソーム膜タンパク質 LMBD1 の異種発現系の構築. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 金沢, 2013. 11
- 9) 岡元拓海, 川口甲介, 金林峰, 守田雅志, 今中常雄: ABC トランスポーター ABCD4 のリソソームへの局在化における LMBD1 の役割. 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 東京, 2013. 11

- 10) Morita M, Kostsin DG, Yamazaki K, Arimura K, Shimozawa N, Imanaka T: Screening of chemical compounds that stabilize ABCD1 protein with missense mutation. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013
- 11) Yokoyama K, Hama K, Nagai T, Nishizawa C, Ikeda K, Morita M, Nakanishi, H, Imanaka, T, Shimozawa N, Taguchi R, and Inoue K, Inoue K. Molecular species of phospholipids with very long chain fatty acids in skin fibroblasts of Zellweger syndrome. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases. Tokyo, Nov. 2013.
- 12) Okamoto T, Kawaguchi K, Morita M, Imanaka T: Subcellular localization of ABC transporter ABCD4 is regulated by LMBD1. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸, 2013, 12

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録
2. 実用新案登録
3. その他  
なし

## 小児 ALD 脳波における突発性徐波 ～未発症例の超早期診断に向けて～

分担研究者：加我 牧子（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所）

### 研究要旨

小児副腎白質ジストロフィー症 ALD の前頭型 6 例、後頭型 15 例、未発症型 11 例につき安静覚醒時に前頭、中心、頭頂、後頭の 4 電極から記録されたデジタル脳波の  $\delta \sim \gamma$  周波数帯域毎にフーリエ解析を行い、特に  $\delta$  波含有量について脳表電極の前後に分けて検討した。発症例の  $\delta$  波含有量は前頭型では前方、後頭型では後方に多く、未発症型では 3 例が前頭型、5 例が後頭型に類似した型を示した。臨床的に前頭型に類似していた 2 例で、治療後は前方の  $\delta$  波含有量の減少が認められ、後頭型に類似していた 1 例でも、治療後に後方の  $\delta$  波含有量の減少が認められた。未発症型で徐波分布が後頭型に類似した型を示した 5 例中 3 例ではすでに報告した未発症例の特徴である視覚誘発電位 VEP の高振幅も認められた。脳波の周波数解析が ALD の早期診断と発症部位推定に役立つ可能性を示唆した。今後症例を重ねての検討が必要である。

研究協力者氏名

崎原ことえ、軍司敦子、中村雅子、稲垣真澄

国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所知的障害研究部

役だつのではないかと考え検討してきた。今年度は昨年度よりも症例数と検討回数を増やして局財政徐波の存在の有用性について検討することを目的とした。

### A. 研究目的

小児副腎白質ジストロフィー症（ALD）、特に大脳型の自然歴では発症後数年以内に死に至ることが知られ、発症早期の幹細胞移植のみが現実的には唯一の治療法となっている。大部分が伴性劣性遺伝で、発端者親族では新生児期からの ALD と診断される症例も現実のものとなっている。この間の班研究の中で、MRI 病変が確認される前に神経心理学的検査に異常を生じる症例の存在を明らかにし、発症前の視覚誘発電位 VEP の高振幅も指摘してきた。しかし発症をより早期に、より簡便に診断できる方法を確立することは喫緊の課題である。これまでの研究の一環として聴覚事象関連電位を記録中に突発的な徐波の存在が確認してきており、これが発症の超早期の診断に

### B. 研究方法

2005 年 1 月から 2013 年 9 月までの間に幹細胞移植治療前後の評価のため当院に紹介された 20 歳以下の小児 33 例（のべ評価回数 71 回）を対象として解析を行うことにした。このうち 24 症例は治療前に受診された。これらの症例のうち後頭型は 16 例（10 例）、前頭型は 6 例（5 例）、未発症型 11 例（9 例）であった（括弧内は治療前受診例）。解析対象とした脳波は本研究班における検査の一環である聴覚性事象関連電位検査（頭頂部緩反応とミスマッチネガティビティを純音および言語音を課題として記録するため合計計 4 種類）に際して 4 か所の電極（前頭部 Fz、中心部 Cz、頭頂部 Pz、後頭部 Oz）において記録されたデジタル脳波について、 $\delta \sim \gamma$ （2-45Hz）の周

波数帯域毎にフーリエ解析を行った。特に $\delta$ 波含有量は電極の脳表前半(FzとCz)と後半(PzとOz)に分けて分析した。眼球運動や体動などアーチファクトが混入している脳波は除外した。

(倫理面への配慮)

紹介もと病院での主治医の説明に加えて、当院来院時に患児および保護者に、上記検査について説明し、同意を得たうえで検査を実施した。

### C. 研究結果

発症例の $\delta$ 波含有量は、前頭型6例中4例ではFz、Czにより多く、後頭型の発症例16例中11例でPz、Ozにより多く認められた。前頭型の6例中2例は例外的に $\delta$ 波含有量がPz、Ozに多く認められた。この2症例は視知覚の異常やVEPの高振幅が見られるなどの後頭葉発症を示唆する非典型的な所見を示していた。後頭型でFz、Czの $\delta$ 波の方が多かった症例はなかった。このように $\delta$ 波の含有量分布は例外があるものの発症型に一致し、同一児では課題間の再現性が認められた。また $\delta$ 波含有量には個人差が大きいという特徴がみられた。未発症型では前頭型類似パターンを示した者が3例、後頭型に似たパターンを示した者が5例あった。前頭型に似たパターンを示した未発症型の2例と後頭型に似たパターンを示した未発症の1例は、臨床的にもMRIの変化も認められない状態で幹細胞移植治療を受け、治療後にはいずれも $\delta$ 波含有量が減少していることが確認された。未発症型の後頭型に類似した型を示した5例中3例では、閃光刺激によるVEPの高振幅も認められた。

### D. 考察

脳波上の $\delta$ 波含有量と局在はALDの早期診断と局在部位の推定に役立つ可能性がある。今後、症例を重ね、治療前後の脳波の徐波含有量変化を検討し、早期診断の真の指標として確立しうるかどうか検討する必要がある。

### E. 結論

小児ALDにおいて脳波の局在性徐波化が、早期診断に際して発症と発症部位の推定に役立つ可能性を指摘した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Yasumira A, Kokubo N, Kaga M, et al : Neurobehavioral and hemodynamic evaluation of Stroop and reverse Stroop interference in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. Brain & Development. (in press).
- 2) Tsujimoto S, Yasumura A, Kaga M et al. Increased prefrontal oxygenation related to distractor-resistant working memory. Child Psychiatry Hum Development 44:678-688, 2013.
- 3) Inoue Y, Ito K, Kaga M, et al, Psychometric properties of Japanese version of the Swanson, Nolan, and Pelham, version-IV Scale-Teacher Form: A study of school children in community samples. Brain & Development. (in press)

#### 2. 学会発表

- 1) 加我牧子, 軍司敦子, 中村雅子, 崎原ことえ, 稲垣真澄: 聴覚失認の神経生理学. 第43回日本臨床神経生理学会学術大会.高知, 2013. 11

### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

# 分担研究報告書

## Ⅲ. 新規治療法の開発

新しい治療法の開発（ケミカルシャペロン療法）  
神経型ゴーシェ病の治療マーカーとしての  
髄液グルコシルスフィンゴシン濃度と対光反射

分担研究者：成田 綾（鳥取大学医学部脳神経小児科・助教）

**研究要旨**

ゴーシェ病に対する酵素補充療法は臓器腫大や血液学的所見を改善させる。しかし、酵素製剤は脳血液関門を通過出来ない為、本邦のゴーシェ病患者の過半数を占める神経型の治療として、酵素補充療法の効果は乏しく、中枢神経系を標的とした新規治療法の開発が望まれている。我々は2010年より鳥取大学倫理委員会の承認を受け、神経型ゴーシェ病患者に対し、アンブロキシソールによるケミカルシャペロン療法を開始している。この臨床研究を行うに当たり、中枢神経症状の早期発見ならびに治療効果を判定する客観的指標の重要性を認識し、本年度はその探索を行った。

まず、生化学的指標として、神経型ゴーシェ病の神経変性の病態に関与すると考えられているグルコシルスフィンゴシンの髄液中濃度をLC-ESI-MS/MSを用いて測定した。神経型ゴーシェ病患者13例と正常コントロール26例で比較したところ、神経型ゴーシェ病患者は正常の29倍と著明な増加を認めた。そして、アンブロキシソールによるシャペロン療法を施行した6例において治療前後で比較したところ、全例で低下を認めた。

次に、生理学的指標として、ゴーシェ病における中枢神経系の症状として対光反射の異常の有無を、赤外線電子瞳孔計を用いて定量的に評価した。ゴーシェ病患者15例（非神経型2例、神経型13例）と正常コントロール33例で比較したところ、神経型ゴーシェ病患者において、著明な潜時の遅延ならびに縮瞳率の低下を認めた。非神経型ゴーシェ病患者では異常を認めなかった。シャペロン療法を施行した6例のうち、評価が可能であった4例に関して全例で潜時ならびに縮瞳率の改善を認めた。

これらより、髄液グルコシルスフィンゴシン濃度と対光反射の異常は、神経型ゴーシェ病の疾患マーカーとなり、また治療効果判定指標としても有用である事が示唆された。

**研究協力者**

大野耕策・山陰労災病院・病院長  
鳥取大学医学部脳神経小児科・名誉教授

**A. 研究目的**

ゴーシェ病はライソゾーム酵素の一つであるグルコセレブロシダーゼの欠損により、その基質であるグルコセレブロシドが肝、脾、骨髄、神経系等に蓄積することで発症する遺伝性疾患で、臨床的には神経症状を呈さないI型と、神経症状を呈するII型およびIII型に分類される。

現在、酵素補充療法が開発され、治療により肝

脾腫、貧血などの身体症状は改善するが、酵素製剤は血液脳関門を通過しないため、神経症状に対する効果は認められていない。

そこで我々はゴーシェ病の中樞神経系の治療法の開発を行ってきた。2009年にナダのグループがFDA承認薬をスクリーニングし、市販薬であるアンブロキシソール（ムコサル、ムコソルバン）が、非神経型の原因変異であるN370S変異の酵素活性をあげることを見いだした。アンブロキシソールは低分子化合物である為、血液脳関門を通過し、神経症状への効果が期待できる。また、去痰剤として汎用されている薬剤であり、安全性や薬物動態が比較的明らかにされていることから、より早期の臨床応用が期待できると考えた。

そこで我々は2010年より鳥取大学医学部倫理審査委員会の承認を得た後、患者家族の同意を得て神経型ゴーシェ病患者に対して、アンブロキシソール投与を行い、シャペロン療法の安全性を評価しており、高い忍容性を確認している。

有効性の評価には、従来の痙攣発作頻度の観察や電気生理検査、頭部MRI、末梢血リンパ球のグルコセレブロシダーゼ活性測定を行った。酵素活性は全ての患者において評価が可能であったが、臨床症状は多様であることから、臨床症状を一律に同一評価方法で行う事は困難であった。また、通常MRIやMRS、電気生理検査所見も患者毎に様々であることから、中樞神経系に特異的で、どの患者にも適応できる客観的な評価方法の開発が必要であった。

そこで本研究では、生化学的指標として髄液グルコシルスフィンゴシン濃度を、生理学的指標として対光反射を正常コントロールと比較し、評価法として有用であるかを検討した。

## B. 研究方法

### (1) 髄液グルコシルスフィンゴシン

対象：

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者ならびに正常コントロール群

方法：

グルコシルスフィンゴシンと内部標準（リゾラクトシルセラミド）は購入した（MATREYA LLC (PA, USA)）。QTRAP 5500 triple quadrupole mass spectrometer (AB SCIEX, MA, USA)を用いて precursor-product ionを検出し、それによって抽出されたサンプルをLC-ESI-MS/MS (Shimadzu Nexera UHPLC、京都、日本)にて測定した。統計解析はMann-Whitney検定ならびにpaired t検定を用いた。

### (2) 対光反射

対象：酵素補充療法を施行中のゴーシェ病患者（神経型ならびに非神経型）ならびに正常コントロール群

方法：10分間の暗順応の後、赤外線電子瞳孔計（イリスコーダデュアルC10641、浜松ホトニクス、浜松、日本）を用いて両眼の対光反射の潜時と縮瞳率を計測した。

### (3) シャペロン療法の効果

対象：神経型ゴーシェ病患者

方法：上記(1)、(2)に関して、ベースラインの評価を行ったのち、アンブロキシソール25mg/kg/日を酵素補充療法に併用し、経口・経管投与を開始し、治療後の効果評価した。

本研究は鳥取大学倫理委員会の承認を得て、本人ならびに保護者の同意を得て行った。また、(3)に関しては、UMIN-CTRにも登録済である(UMIN000009392)。

## C. 結果

### (1) 髄液グルコシルスフィンゴシン

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者13例（Ⅱ型6例、Ⅲ型7例、中央値2.2歳、6ヶ月～49歳）ならびに正常コントロール26例（中央値2.5歳、3ヶ月～18歳）にて測定



を行った。

神経型ゴーシェ病では平均 29 倍（中央値 88.0 pg/ml、26.6-2000 pg/ml）とコントロール群（中央値 2.81 pg/ml、0-8.49 pg/ml）に比して有意に上昇していることが確認された（図 1）。II型とIII型の比較では、統計学的有意差は認めなかったが、乳児期発症急性進行性のII型（中央値 237.45 pg/ml）が慢性進行性であるIII型（中央値 83.95pg/ml）より高値であった。

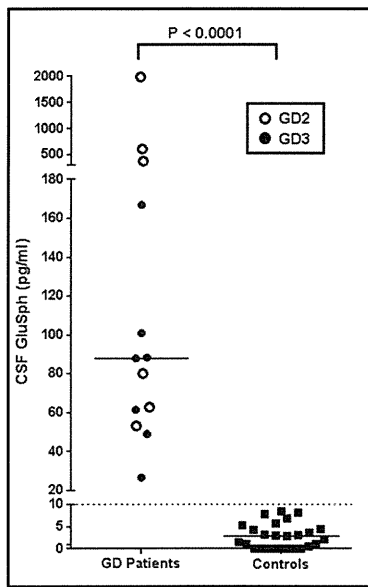


図 1 髄液グルコシルスフィンゴシン

アンプロキソールによるシャペロン療法（25mg/kg/日）をベースラインの評価後に開始し、髄液グルコシルスフィンゴシン（6例）ならびに対光反射（4例）の測定を12ヶ月後に施行した。

髄液グルコシルスフィンゴシンは全例で治療開始12ヶ月後にベースラインより低下を認めた（図2）。

対光反射に関しても、評価が可能であった4例に関して、ベースライン時には反応が消失していた3例で波形の再出現を認めた。残り1例も縮瞳率および潜時の改善を認めた（図3）。

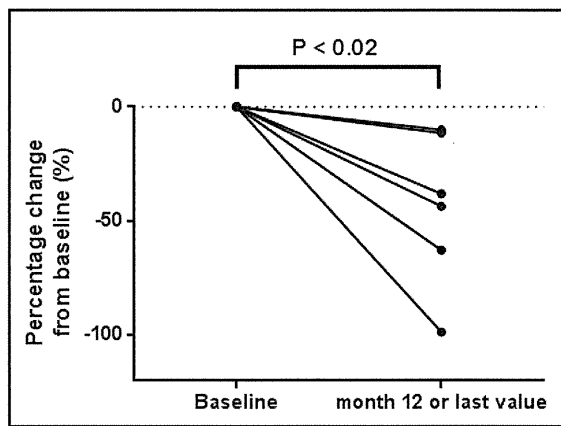


図 2 髄液グルコシルスフィンゴシンの変化

## (2) 対光反射

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者15例（I型2例、II型6例、III型7例）ならびに正常コントロール33例（コントロール1：n=30、平均年齢23歳、22~37歳、コントロール2：n=3、平均年齢4.7歳、4~6歳）にて測定を行った。

神経型（II型およびIII型）ゴーシェ病では12/13例（92.3%）に潜時の遅延や縮瞳率の低下を認めた。非神経型（I型）の2例にはいずれの異常も認めなかった。

## (3) シャペロン療法の効果

酵素補充療法を行っている神経型ゴーシェ病患者6例（II型2例、III型4例）に対して

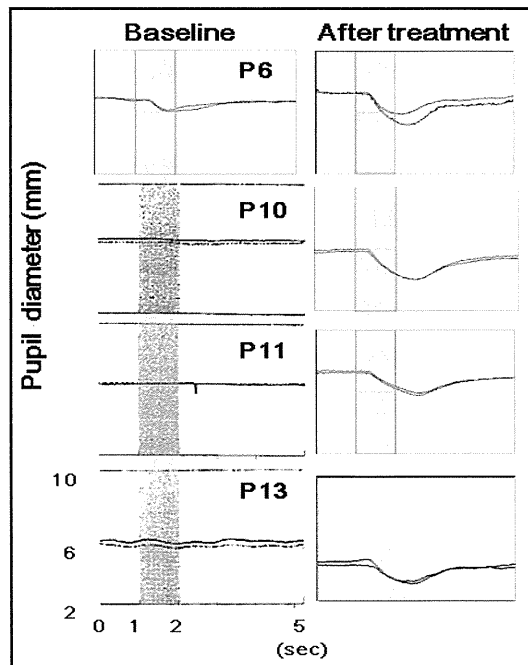


図 3 対光反射の変化

## D. 考察

本研究では、LC-ESI-MS/MS を用いて髄液グルコシルスフィンゴシンの安定した測定系を構築した。LC-ESI-MS/MS による髄液グルコシルスフィンゴシンの測定は初の報告となる。

この測定系を用いると、神経型ゴーシェ病では年齢や神経学的重症度、先行する酵素補充療法等の患者背景に影響を受けず、髄液グルコシルスフィンゴシンの有意な上昇を認めた。グルコシルスフィンゴシンはゴーシェ病の蓄積基質であるグルコセレブロシドが脱アシル化されて合成されるリゾ体で、神経型の中樞神経に過剰蓄積し、神経変性に関与すると考えられている。グルコシルスフィンゴシンの主な供給源はスフィンゴ脂質が過剰に蓄積したゴーシェ細胞と考えられているため、血清中でも検出可能だが、酵素補充療法にて低下するため、先行する酵素補充療法の時期や投与量が均一でない患者群での評価は困難である。一方で髄液では酵素補充療法が移行しないため、先行治療歴に関わらず評価が可能であり、中樞神経系の評価として特異性が高いと考える。

加えて、全例でシャペロン療法後に低下を認めたことは、シャペロンによる変異酵素の安定化が促進された結果、グルコセレブロシドやグルコシルスフィンゴシンの分解と蓄積の抑制が得られた事を示唆するものであり、治療効果の客観的指標として有用であると考えられた。

また、神経ゴーシェ病では対光反射の異常が生じる事も、電子瞳孔計による客観的評価系を用いる事ではじめて明らかにした。ゴーシェ病で対光反射の生じる機序は明確ではないが、網膜～視神経～中脳～動眼神経に至る対光反射経路のいずれかの神経機能不全がゴーシェ病では生じており、基質の減少に伴って、神経回路の機能不全が改善する結果、消失していた対光反射が再出現するものと考えられる。今回の症例では視神経や動眼神経に明らかな障害を認めなかったこと、またムコ多糖症などの他のライソゾーム病では網膜のグリア細胞に基質が蓄積する事が知られてい

ることなどから、ゴーシェ病でも網膜や脳幹のグリア細胞の機能不全によるがあるも推測され、今後更なる研究を進めていくこととしている。

## E. 結論

神経型ゴーシェ病では髄液グルコシルスフィンゴシンが増加し、対光反射の異常を呈する事が明らかになった。また、シャペロン療法を行う事で、両パラメーターの改善を確認する事が出来た。

これらより髄液グルコシルスフィンゴシンならびに対光反射測定は、神経型ゴーシェ病の早期診断とシャペロン療法による中樞神経治療に対する客観的評価法として有効であることが示唆された。

今後は症例数を増やし、非神経型の評価も加え、より神経型の指標としての特異性を検討するとともに、シャペロン療法の効果判定法としての有効性を更に検証していく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 成田綾、大野耕策：先天代謝異常症と眼； Gaucher 病の眼科所見と治療. 神経眼科 29 (3) : 303-309、2012

### 2. 学会発表

- 1) Aya Narita, Kousaku Ohno, et al. Chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease. 13<sup>th</sup> Lysosomal Disease Network World Symposium .Orlando, Feb. 2013
- 2) 成田綾、板村真司、大野耕策他 神経型 Gaucher 病に対するアンブロキソールを用いたケミカルシャペロン療法 第 55 回日本小児神経学会学術集会.大分,2013.5
- 3) Aya Narita, saori Kosugi, Kosaku Ohno, et al. Elevated CSF Glucosylsphingosine in neuronopathic Gaucher disease: relation to phenotype and therapeutic response with chaperone therapy. The 55th Annual

meeting of JSIMD/The 3rd ACIMD,  
maihama, Nov.2013

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析に関する研究

分担研究者：難波 栄二（鳥取大学生命機能研究支援センター教授）

### 研究要旨

β-ガラクトシダーゼ欠損症患者 4 検体（GM1-ガングリオシドーシス 2 検体、モルキオ B 病 2 検体）について遺伝子変異解析を行った。患者由来の皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロン化合物 NOEV と 6S-NBI-DGJ の残存酵素活性に対する上昇効果を検討した。

### A. 研究目的

β-ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、患者由来培養皮膚線維芽細胞に対するケミカルシャペロンの効果の有無を判定し、変異型との相関を明らかにすることで、新規シャペロン療法開発のための基礎的な知見を得る目的で研究を行った。

### B. 研究方法

#### 1. β-ガラクトシダーゼ遺伝子変異解析

β-ガラクトシダーゼ欠損症患者由来培養皮膚線維芽細胞および血液検体からゲノム DNA を抽出し、全エクソンについてシーケンス解析を行った。

#### 2. GM1-ガングリオシドーシス患者皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討

培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討は 0.2、2 μM の NOEV

（N-octyl-4-epi-β-valienamine）または 20、80 μM の 6S-NBI-DGJ を含む培地で 4 日間培養後、細胞抽出液のβ-ガラクトシダーゼ酵素活性を 4-MU 人工基質を用い測定し行った。

### C. 研究結果

GM1-ガングリオシドーシス 2 検体について遺伝子変異解析を行い、M1C/R49G および R59H/R59H 変異を同定した。モルキオ B 病 2 検体においては、R482H/T500A、R68Q/T500A 変異をそれぞれ同定した。

GM1-ガングリオシドーシス患者（R59H/R59H）由来培養皮膚線維芽細胞に対するシャペロン効果の検討の結果、NOEV と 6S-NBI-DGJ いずれも有効性を示さなかった。

### D. 考察

今回同定した変異のうち、GM1-ガングリオシドーシス 2 検体で同定された R59H は Inf GM1 の変異として既に報告された変異であったが、M1C と R49G 変異は報告のない変異型であった。また、モルキオ B 病 2 検体においては、R482H と T500A はモルキオ B 病の変異として報告のある変異で、R68Q は Inf GM1 の変異として報告されている。モルキオ B と GM1 の変異をヘテロで持つ患者においては、骨格異常と中枢神経症状を示す症例の報告もあるが、今回の R68Q/T500A 変異の症例では、現時点で中枢症状は示しておらず、今後の経

過観察が必要と考えられる。

シャペロン化合物 NOEV, 6S-NBI-DGJ とともに R59H 変異細胞に対する有効性を認めなかったが、これは以前の我々の変異 cDNA 発現細胞系の結果と一致する。今後はこのような既存の化合物が有効性を示さない変異型に有効な新規化合物の探索が必要と考える。

## E. 結論

$\beta$ -ガラクトシダーゼ欠損症の遺伝子変異解析を行い、変異を同定した。患者由来皮膚線維芽細胞に対する2つのシャペロン化合物の有効性を検討した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Luan Z, Li L, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ohno K, The chaperone activity and toxicity of ambroxol on GD cells and normal mice. *Brain Dev*, 2013 35: 317-322.
- 2) Takai T, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Yu L, Ninomiya H, García-Moreno I, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y, A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *Mol Ther*, 2013 21: 526-532.
- 3) Higaki K, Ninomiya H, Suzuki Y, Nanba E. Two candidate molecules for chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis. *Future Med Chem*.

2013 5(13): 1551-1558.

### 2. 学会発表

- 1) 難波栄二. ライソゾーム病に対するシャペロン療法. 第2回先天代謝異常症患者会フォーラム. 東京, 2013. 8
- 2) 難波栄二, 檜垣克美, 高井知子, 由良敬, 榊原康文, Carmen Ortiz Mellet, Jose M. Garcia Fernandez, 鈴木義之.  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ欠損症に対するシャペロン治療薬の開発. 第58回日本人類遺伝学会. 仙台, 2013. 11
- 3) Nanba E. Chaperone therapy for lysosomal storage diseases. The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55<sup>th</sup> Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013
- 4) Takai T, Higaki K, Suzuki Y, Nanba E. Comparison of two Chaperone candidates for treatment of GM1-gangliosidosis. The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55<sup>th</sup> Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013
- 5) Hossain MA, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ozono K, Sakai N. NOEV treatment option for Japanese late-onset Krabbe disease. The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases / The 55<sup>th</sup> Annual Meeting for The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases. Chiba, Nov. 2013

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## レンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療法の開発

分担研究者：小林 博司（東京慈恵会医科大学総合医科学研究所遺伝子治療研究部）

### 研究要旨

ムコ多糖症 VII 型(MPSVII、スライ病)、およびクラッペ病は、ライソゾーム性分解酵素欠損による常染色体劣性遺伝病である。我々は組換えレンチウイルスベクターを用いてこの二疾患に対する遺伝子治療の検討を進めた。まず MPSVII の欠損酵素 HBG を組込んだレンチウイルスを作成し、新生児モデルマウスへの静脈注射により、生命予後の改善、中枢神経系への長期遺伝子発現、オートファジー活性の変化も得られた。次にクラッペ病の欠損酵素 GALC を組込んだレンチウイルスも開発し、細胞株およびマウス新生児での肝臓での酵素発現上昇、脳でのサイコシン蓄積の減少が見られた。更に基質合成阻害薬を併用することで相乗効果的な生命予後の改善が見られた。またタンパク質のミスフォールディングによる遺伝子発現の低下などを抑制する目的で組込む遺伝子のシーケンスを改変した codon optimization GALC を組み込み、同様に効果を検討した。

研究協力者： 有賀賢典 東京慈恵会医科大学  
助教

### A. 研究目的

ムコ多糖症およびクラッペ病の根本的治療としての有効な遺伝子治療の開発

### B. 研究方法

#### 1. 組換えレンチウイルス

HIV 由来であり NEF,VIF などの副蛋白を除去し、IRES 配列を介してレポーター遺伝子として GFP を組込んだレンチウイルスベクターに MPSVII の欠損酵素 HBG、さらに Krabbe 病の欠損酵素 GALC をクローニングし、2種類の組換えレンチウイルスを作成した。

#### 2. 細胞培養

実験に使用する 293A 細胞は 10%ウシ胎児血清と抗生物質とを加えた DMEM(D-10)培地を用いて、5%二酸化炭素の環境下において、37℃で培養した。これに対し組換えウイルスを希釈を系列を作って感染させ、GFP および欠損酵素の力価を計測した。

#### 3. 新生児マウスへの投与：

日令 0-2 の新生児マウスの顔静脈へ作成した組換えウイルスを静脈注射し、5 週間で臨床所見、病理、脳、肝臓などでの欠損酵素およびレポーター遺伝子発現を評価した。MPSVII ではグリコサミノグリカン、クラッペ病ではサイコシンといった蓄積物質の評価も行った。更にクラッペ病では

基質合成阻害剤 L-シクロセリンを遺伝子治療を行ったマウス群で日齢 5 から隔日で皮下注射し効果を検討した。

またタンパク質のフォールディングによる遺伝子発現の低下などを抑制する目的で組み込む遺伝子のシーケンスを改変した codon optimization GALC を（Gen Script 社に依頼合成）組み込み、同様に新生児注射による効果を検討した。

### C. 研究結果

1. MPSVII の欠損酵素 HBG を組み込んだウイルスを感染させた細胞株（293A）は HBG と GFP 両方の発現が容量依存性に見られ、FITC フィルタを用いた蛍光顕微鏡では GFP 発現細胞を数多く確認できている。新生児モデルマウスへの遺伝子導入では 30 週齢を超えても中枢神経系への遺伝子発現が realtime PCR により確認され、更に主要臓器での蓄積物質の減少も見られた。また脳組織での LC3 I/II といったオートファジー活性を示すマーカー蛋白質をウエスタンブロットで検討したところオートファジービルドアップが無治療群に比べて遺伝子治療群では抑制されていたが、7 週令に比べて 31 週令ではややその効果が減弱していた。更に生命予後も有意差を持って改善していた(p<0.01)。

2. Krabbe 病の欠損酵素 GALC を組み込んだウイルスを感染させた細胞株（293A またはオリゴドンドロサイト細胞株：下図 1）では GALC, GFP 両方の発現が見られ、モデルマウスへの新生児注射で

は1週間後の肝において正常の10%の酵素活性が得られた。更に5週齢の脳ではサイコシンの減少が有意に見られた。また基質合成阻害剤L-シクロセリン併用群では生命予後、症状発現遅延効果において有意な所見が得られた。codon optimization GALCを組込んだレンチウイルスベクターによる新生児遺伝子治療では細胞株において十分なover expressionが見られたが、in vivoでも体重増加などでやや優位性が見られた。

図1 ヒトオリゴデンドロサイト細胞株へのレンチウイルスベクターによるGFP遺伝子導入

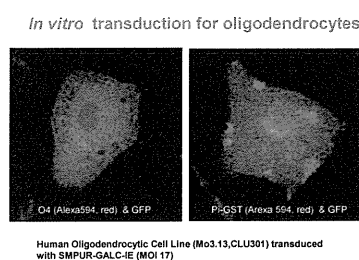
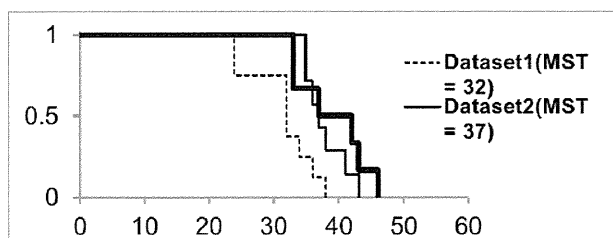


図2 Krabbe病モデルマウスの生存曲線



点線：無治療群

実線：遺伝子治療群 (p=0.03)

太線：遺伝子治療・基質阻害剤併用群 (p=0.013)

#### D. 考察

MPSVII に関しては生命予後の改善、導入遺伝子の長期発現が証明され遺伝子治療のin vivoでの有用性が示唆された。クラッペ病でも有意な生命・症状発現遅延効果が得られ、基質合成阻害剤やcodon optimization GALCを用いることで更に相乗効果が期待された。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

- 1) Kobayashi H., Izuka S., Ariga M, et al. Gene therapy for mouse model of Krabbe disease. 16<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT) 2013.May Saltlakecity, UT.
- 2) 小林博司、飯塚佐代子ほか レンチウイルスベクターを用いたクラッペ病に対する遺伝子治療 第19回日本遺伝子治療学会 岡山、2013年7月
- 3) Gene Therapy for KrabbeDisease. Hiroshi Kobayashi, Yota Shimada, Takeo Iwamoto, Tkakahiro Fukuda, Masamichi Ariga, Yohei Sato, Taichi Wakabayashi, Sayoko Izuka, Yoshikatsu Eto, Hiroyuki Ida, Toya Ohashi. (P-101) The 3<sup>rd</sup> Asian Congress for Inherited Metabolic Disease (ACIMD) and The 55<sup>th</sup> Annual Meeting for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD) joint meeting 2013. Nov., Chiba, Japan.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## クラッペ病のシャペロン療法の開発

分担研究者：酒井 規夫（大阪大学大学院医学系研究科 小児科学講座）

### 研究要旨

クラッペ病はライソゾーム病の一つであり、遺伝性白質ジストロフィーとして治療法は早期の造血細胞移植しかなく、現実には治療の適応がない症例も多い。我々はクラッペ病の病態解明を行なってきたおり、その分子生物学的解析を応用して、シャペロン療法の有効性について解析したので報告する。

### A. 研究目的

クラッペ病はライソゾーム病の一つであり、進行性の脱髄疾患である。唯一の治療法が遅発型に対する造血幹細胞移植であるが、治療のリスクもあり、神経症状のごく早期に施行しないと有効性は少なく、多くの患者さんに適応できないものである。我々は同じ $\beta$ ガラクトシダーゼ欠損症である G<sub>M1</sub> ガングリオシドーシスに有効であることが証明された NOEV(*N*-octyl-4-*epi*- $\beta$ -valienamine)の有効性を解析し、シャペロン療法の可能性をさぐることを目的とした。

### B. 研究方法

1) ガラクトセレブロシダーゼに対する NOEV の阻害実験；正常酵素の発現系における酵素溶液に対する NOEV の濃度依存性の効果をしらべた。  
2) ガラクトセレブロシダーゼの熱不安定性に対する NOEV の効果；一過性発現系を pSVL に組み込んだ正常と各種変異酵素 cDNA の発現ベクターを構成し、COSI 細胞に発現させた。その酵素を含む細胞抽出液を用いて、48度の熱処理を0-15分行ない、NOEV の濃度をふ

ってその酵素活性に与える影響を調べた。

3) ガラクトセレブロシダーゼの発現系を用いた *in vivo* での NOEV の効果；正常と各種変異の発現ベクターを COSI 細胞に導入し、その後培養液に 0-20  $\mu$ M の NOEV を添加して、5日後の酵素活性を解析した。そして、それぞれのサンプルの Western blot を行ない、ガラクトセレブロシダーゼの解析を行ない、前駆体と成熟蛋白の量を解析した。

### C. 研究結果

1) ガラクトセレブロシダーゼに対する NOEV の阻害実験；NOEV は *in vitro* の酵素活性測定系において、濃度依存性に正常蛋白の酵素を阻害し、有効な酵素阻害剤であることが証明された。

2) ガラクトセレブロシダーゼの熱不安定性に対する NOEV の効果；NOEV は *in vitro* の酵素活性測定系において、濃度依存性に正常蛋白も変異タンパク質も濃度依存性に熱安定性を向上させた。その効果は正常蛋白に最も強く、次に遅発型の変異、乳児型変異にはやや弱い効果が得られた。

3) ガラクトセレブロシダーゼの発現系を用



いた *in vivo* での NOEV の効果；酵素活性に対する効果としては乳児型の変異に対してはその有効性は明らかでなかったが、遅発型の変異 4 つに対してはいずれも有効性が見られ、2  $\mu$ M で最大の効果を認めた。(図 1)

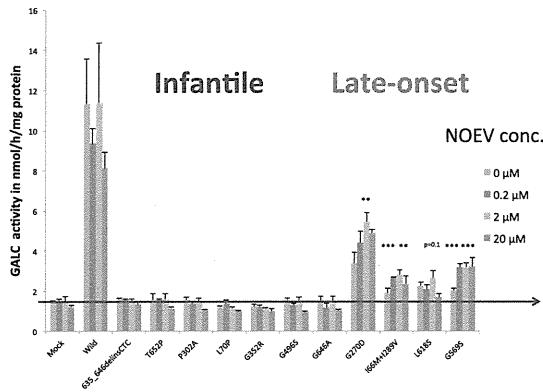


図 1

また、Western blot からは前駆体の量は変異にあまり関係ないが、ライソゾームに運搬されたあとにプロセスされて成熟すると言われている成熟タンパク質の量は、正常蛋白、遅発型変異に多く、乳児型蛋白は成熟蛋白をほとんど認めないことが判明した。(図 2)

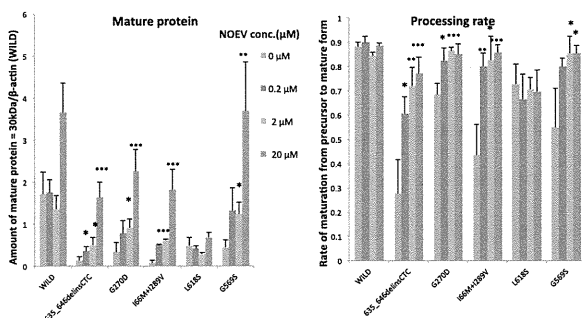


図 2 n

00

#### D. 考察

G<sub>M1</sub> ガングリオシドーシスに有効性の証明されたケミカルシャペロン NOEV は、クラッペ病の原因酵素ガラクトセレブロシダーゼの阻害効果も認め、その熱安定性を増大させることがわかった。*in vivo* で変異酵素の酵素活性の増大は、

遅発型の変異で明らかであり、重症な乳児型には効果は弱いと考えられた。

そして、活性の上昇する変異は成熟蛋白の増加が認められており、NOEV により ER からライソゾームへの運搬が高率良く行なわれていることが判明した。

#### E. 結論

ケミカルシャペロン NOEV は、クラッペ病の原因酵素ガラクトセレブロシダーゼの高頻度の遅発型変異 4 つに対し、そのライソゾームへの運搬効率を上昇し、成熟タンパク量を増やすことによって治療効果が想定される。今後、モデル動物においてその有効性を確認したい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hara M, Inokuchi T, Taniwaki T, Otomo T, Sakai N, Matsuishi T, Yoshino M., An adult patient with mucopolidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism., *Brain Dev.* 35(5):462-5, 2013
- 2) Tokushige SI, Sonoo T, Maekawa R, Shirota Y, Hanajima R, Terao Y, Matsumoto H, Hossain MA, Sakai N, Shiio Y., Isolated pyramidal tract impairment in the central nervous system of adult-onset Krabbe disease with novel mutations in the GALC gene., *Brain Dev.* 35(6):579-81, 2013
- 3) Chang B, Gorbea C, Lezin G, Li L, Shan L, Sakai N, Kogaki S, Otomo T, Okinaga T, Hamaoka A, Yu X, Hata Y, Nishida N, Yost HJ, Bowles NE, Brunelli L, Ichida F., 14-3-3ε Gene variants in a Japanese patient with left ventricular noncompaction and hypoplasia of the

corpus callosum., *Gene*. 515(1):173-80, 2013

- 4) Kardas F, Uzak AS, Hossain A, Sakai N, Canpolat M, Yikilmaz A., A novel homozygous GALC mutation: Very early onset and rapidly progressive Krabbe disease., *Gene*. 517(1):125-7, 2013
  - 5) Eto K, Sakai N, Shimada S, Shioda M, Ishigaki K, Hamada Y, Shinpo M, Azuma J, Tominaga K, Shimojima K, Ozono K, Osawa M, Yamamoto T., Microdeletions of 3p21.31 characterized by developmental delay, distinctive features, elevated serum creatine kinase levels, and white matter involvement., *Am J Med Genet A*. 2013 Dec;161(12):3049-56.
  - 6) Hossain MA, Otomo T, Saito S, Ohno K, Sakuraba H, Hamada Y, Ozono K, Sakai N, Late-onset Krabbe disease is predominant in Japan and its mutant precursor protein undergoes more effective processing than the infantile-onset form., *Gene*. 2013 Nov 16. doi:pii: S0378-1119(13)01515-1. 10.1016/j.gene.2013.11.003.
- ## 2. 学会発表
- 1) 酒井規夫、神経遺伝病治療戦略セミナー、ニーマン・ピック病 C 型の診断と治療、第 55 回日本小児神経学会学術集会、2013.5
  - 2) Norio Sakai, Potential effects and obstacles for NBS of metabolic leukodystrophy, including adrenoleukodystrophy, Krabbe and metachromatic leukodystrophy, Asian Congress for Lysosomal Storage Disease Screening, 2013.5
  - 3) 新寶 理子、青天目 信、近藤 秀仁、Mohammad Arif Hossain、濱田 悠介、酒井規夫、大藪 恵一、当科で診断した GM2 ガングリオシドーシス症例の検討、第 9 回近畿先天代謝異常研究会、2013.6
  - 4) Mohammad Arif Hossain, Michiko Shinpo, Keiichi Ozono, Norio Sakai, Molecular and biochemical diagnosis for three Japanese patients of galactosialidosis, 第 9 回近畿先天代謝異常研究会、2013.6
  - 5) 佐藤友紀、金川武司、酒井規夫、望月秀樹、大阪大学医学部附属病院における羊水染色体検査の現状報告、第 37 回日本遺伝カウンセリング学会、2013.6
  - 6) 酒井規夫、ファブリー病の診療；今患者がもどめるもの、神奈川酵素補充療法研究会、2013.7
  - 7) 酒井規夫、ムコ多糖症と遺伝カウンセリング、第 1 回ムコ多糖症フォーラム、2013.7
  - 8) Hossain MA<sup>1</sup>, Higaki K<sup>2</sup>, Nanba E<sup>2</sup>, Suzuki Y<sup>3</sup>, Ozono K<sup>1</sup>, Sakai N、CHAPERONE THERAPY FOR KRABBE DISEASE; JAPANESE LATE-ONSET MUTATIONS CAN BE TREATED EFFECTIVELY BY NOEV、ICIM2013.9
  - 9) Hidehito Kondo<sup>1</sup>, Michiko Shinpo<sup>1</sup>, Mohammad Arif Hossain<sup>1</sup>, Yusuke Hamada<sup>1</sup>, Norio Sakai<sup>1</sup>, Yoshihiro Asano<sup>2</sup>, Takeshi Masaki<sup>2</sup>, Tadayasu Togawa<sup>3</sup>, Keichi Ozono, A case report of Fabry disease with chronic heart failure treated with amiodarone, ACIMD2013.11
  - 10) Mohammad Arif Hossain<sup>1</sup>, Katsumi Higaki<sup>2</sup>, Eiji Nanba<sup>2</sup>, Yoshiyuki Suzuki<sup>3</sup>, Keiichi Ozono<sup>1</sup>, Norio Sakai<sup>1</sup>, NOEV treatment option for Japanese Krabbe disease, ACIMD2013.11
  - 11) Mohammad Arif Hossain<sup>1</sup>, Michiko Shinpo<sup>1</sup>, Katsumi Higaki<sup>2</sup>, Eiji Nanba<sup>2</sup>, Yoshiyuki Suzuki<sup>3</sup>, Keiichi Ozono<sup>1</sup>, Norio

Sakai<sup>1</sup> , NOEV can stabilize  $\beta$ -galactosidase in galactosialidosis patients' skin fibroblasts effectively and cause normalization of its activity, ACIMD2013.11

- 12) Michiko Shinpo, Sayaka Nakano, Yusuke Hamada, Kouji Tominaga, Shin Nabatame, Takeshi Okinaga, Yoshiko Hashii, Norio Sakai, Keichi Ozono, Outcomes of hematopoietic stem cell transplantation for three patients with metachromatic leukodystrophy , ACIMD2013.11
- 13) Yusuke Hamada<sup>1</sup>, Hidehito Kondo<sup>1</sup>, Michiko Shinpo <sup>1</sup>, Yoshiro Wada<sup>2</sup> , Norio Sakai<sup>1</sup>, Yutaka Sumida<sup>2</sup>, Kiichi Ozono<sup>1</sup>, Different clinical course of propionic acidemia in two siblings, ACIMD2013.11
- 14) Motohiro Akagi<sup>1, 2</sup>, Mohammad Arif Hossain<sup>1</sup>, Keiichi Ozono<sup>1</sup>, Norio Sakai<sup>1</sup>, Yoshinori Okumura<sup>3</sup>, Clinicogenetical features of a Japanese patient with static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood ( SENDA ), ACIMD2013.11
- 15) N. Sakai<sup>1</sup>, X.F. Gu<sup>2</sup>, H. Ida<sup>3</sup> on behalf of the EDGE investigators, O. Kawaguchi<sup>4</sup>, Y. Xue<sup>5</sup>, A phase 3 study evaluating once versus twice daily dosing of eliglustat in patients with Gaucher disease type 1 (GD1): Interim results from the lead in period, ACIMD2013.11
- 16) Akemi Tanaka<sup>1</sup>, Takashi Hamazaki<sup>1</sup>, Motomichi Kosuga<sup>2</sup>. Torayuki Okuyama<sup>2</sup>, Yasuyuki Suzuki<sup>3</sup>, Norio Sakai<sup>4</sup>, Tomo Sawada<sup>1</sup>, Hiromasa Yabe<sup>5</sup>, Mika Ishige<sup>6</sup>, Hideo Mugishima<sup>6</sup>, Shunichi Kato<sup>5</sup>, Efficacy of hematopoietic stem cell

transplantation versus enzyme replacement therapy on intelligence in the patients with Mucopolysaccharidosis type II, ACIMD2013.11

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

特願 2011-101560 (発明の名称：リソソーム病治療用医薬組成物)として2011年4月28日に出願

## ゴーシェ病 III 型に対するムコソルバン療法導入の試み

研究分担者：渡邊 順子（久留米大学 准教授）

### 研究要旨

同種骨髄移植後のゴーシェ病 III 型患者に対しムコソルバン療法を開始するにあたって、治療前判定を行なった。神経症状の進行は思春期半ばまで抑制されており、BMT が臨床症状の進行緩和効果がある可能性が示唆された。ムコソルバン添加時の患者皮膚線維芽細胞では GBA 酵素活性が上昇しており、眼球運動やミオクロヌスの改善を指標に、ムコソルバン療法を導入し、効果判定を行なっていく。

### 研究協力者：

芳野 信 久留米大学・客員教授  
弓削健太郎 久留米大学・助教  
大野耕策 山陰労災病院・院長  
成田 綾 鳥取大学・大学院

### A. 研究目的

ゴーシェ病の治療としては、現在、骨髄移植、酵素補充療法が行われているが、いずれの治療法も神経症状の改善には効果が乏しいと考えられる。III 型の骨髄移植症例に対してムコソルバン療法の効果に期待している。今回、ムコソルバン療法導入にあたり、治療前判定を試みた。

### B. 研究方法

対象は、4 歳時に実兄をドナーとして骨髄移植が行われた 25 歳のゴーシェ病 III 型の女性。

### C. 研究成果

#### 【症例の概要】

9 ヶ月時、喉頭痙攣で発症。3 歳 7 ヶ月時、酵素診断（ $\beta$ -グルコシダーゼ活性低下）および遺伝子解析（D409H/IVS10-1）の結果、Gaucher 病 III 型と確定。4 歳 0 ヶ月時に脾臓摘出後に同種骨髄移植を施行されている。移植後 13 年 6 ヶ月

経過時には、ドナー細胞（野生型ホモ）が 100% であり、酵素活性はドナーと同レベルであり、ドナー細胞の持続的生着が確認された。15 歳前後から歩行障害が出現し、18 歳以降は筋緊張が強くなり、その後も意識消失や全身性の強直発作を時に認めた。20 歳から 1 年 5 ヶ月間、酵素補充療法を行ったが神経症状は不変であったことから中止した。現在は、不随意運動、強直発作のため座位保持が不可能で、主に腹臥位の状態で生活している。

#### ① リンパ球酵素活性測定

GBA 酵素活性は 4.72nmol/mg protein/h (ref.4.69 $\pm$ 1.06)であり、同時に測定した  $\beta$ -gal 活性は 229.7(ref.127.8 $\pm$ 33.6)、 $\beta$ -Hex 活性は 2081.6(ref.1679 $\pm$ 578))であった。開始前のリンパ球 GBA 酵素活性は正常であり、ムコソルバン添加時の培養皮膚線維芽細胞における GBA 酵素活性は約 1.5 倍に増加した。上記より in vivo では、本症例でのムコソルバンの有効性が示唆された。

#### ② 眼球運動・対光反射

追視はゆっくりであれば左右はほぼ制限なく可能、速い動きは特に右方で追視不可。下方は動